

## "مقاله پژوهشی"

## بررسی تاثیر روش لخته‌سازی با استفاده از کلرید آلومینیوم ( $\text{AlCl}_3$ ) بر راندمان برداشت، ضریب تغلیظ و رنگدانه‌های ریز جلبک *Dunaliella salina*

زهرا امینی خوئی<sup>۱\*</sup>، اشکان اژدری<sup>۱</sup>، الناز عرفانی فر<sup>۱</sup>، قاسم رحیمی قره میرشاملو<sup>۱</sup>

۱- مرکز تحقیقات شیلاتی آبهای دور چابهار، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۲/۲۱

### چکیده

برداشت سلول‌های ریزجلبک از محیط کشت رقیق اطراف آنها فرآیندی چالش برانگیز و پرهزینه است که در حدود ۲۰-۳۰ درصد از هزینه‌های کل تولید را به خود اختصاص می‌دهد. بنابراین، یافتن روش مناسب جهت برداشت سویه‌های کاندید تجاری واجد اهمیت است. در مطالعه حاضر تاثیر استفاده از مقادیر مختلف (۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۱ گرم در لیتر) کلرید آلومینیوم ( $\text{AlCl}_3$ ) به عنوان لخته‌ساز بر راندمان برداشت و رنگدانه‌های ریزجلبک *Dunaliella salina* مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا، جدایه بومی ریزجلبک *D. salina* از کشتان پشت سدی لیپار چابهار در شرایط آزمایشگاهی پرورش یافت تا به حداکثر میزان تولید در فاز نمایی رشد رسید. سپس مقادیر مختلف از لخته‌ساز به محیط کشت افزوده شد. در پایان، میزان کارایی  $\text{AlCl}_3$  در فرآیند برداشت و همچنین تاثیر آن بر ترکیب رنگدانه‌های زی توده بررسی شد. امکان استفاده مجدد از محیط کشت لخته شده نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش مصرف کلرید آلومینیوم از ۰/۱ گرم تا ۱ گرم در لیتر راندمان لخته‌سازی به طور معنی‌داری افزایش یافت. این در حالی است که مصرف بیش از ۰/۷ گرم در لیتر از لخته‌ساز کلرید آلومینیوم سبب کاهش معنی‌دار در محتوی رنگدانه‌های کلروفیل، کارتنوئید و بتاکاروتن زی توده برداشتی شد ( $p < 0.05$ ). بنابراین برای حفظ کیفیت زی توده برداشت‌شده استفاده از ۰/۷ گرم در لیتر کلرید آلومینیوم با راندمان ۷۵ درصد برای برداشت ریز جلبک *D. salina* پیشنهاد می‌گردد.

**کلمات کلیدی:** ریز جلبک، *Dunaliella salina*، لخته‌سازی، راندمان برداشت، بتاکاروتن

## مقدمه

از دیدگاه تولید تجاری ریزجلبک *Dunaliella salina* به دلیل داشتن رنگدانه‌های کاروتنوئید و به طور ویژه بتاکاروتن مورد توجه بازارهای جهانی است. ارزش تجاری کاروتنوئیدها در سال ۲۰۱۹، در بازار جهانی در حدود ۱/۸ بلیون دلار پیش‌بینی شده است (Widowati et al., 2017). از ویژگی‌های زیستی ممتاز این ریزجلبک تحمل زیاد شوری (تا ۳۰۰ قسمت در هزار) است که این خصوصیت باعث شده است کشت تک گونه‌ای و عاری از آلودگی آن در مقیاس انبوه امکان‌پذیر باشد (Morowvat and Ghasemi, 2016). تولید انبوه این ریزجلبک در مناطقی با آب و هوای گرم، با تابش نورخورشید بالا و آب بسیار شور با موفقیت بیشتری روبه‌رو است (Hejazi et al., 2004). این ریزجلبک به دلیل دارا بودن اسیدهای چرب غیر-اشباع، رنگدانه‌های ارزشمند و گلیسرول قابل استفاده در صنایع مختلف به ویژه صنایع دارویی و آرایشی و بهداشتی می‌باشد. اما یک چالش در مسیر تولید انبوه ریزجلبک‌ها به ویژه سویه‌های ریزساز مصرف بالای انرژی و هزینه‌های زیاد مربوط به جمع‌آوری و برداشت زی‌توده کم از محیط کشت اطرافشان است (Buelna et al., 1990; Kwon et al., 2014). به طور کلی غلظت زی‌توده ریزجلبک‌ها بسیار کم و به طور متوسط در محدوده ۰/۱ تا ۳ گرم در لیتر است (شعبانزاد و همکاران، ۱۳۹۸). به همین خاطر جمع‌آوری خمیر غلیظ از سوسپانسیون رقیق آنها کاری بسیار دشوار با مصرف انرژی و هزینه بالا محسوب می‌شود (Grima et al., 2003). برای غلبه بر این چالش و افزایش راندمان برداشت زی‌توده، روش‌های مختلفی پیشنهاد و به کار

گرفته شده است. این روش‌ها شامل استفاده از<sup>۲</sup> سانتریفیوژ، فیلتراسیون<sup>۳</sup>، ته‌نشینی<sup>۴</sup>، معلق‌سازی<sup>۵</sup> و انعقاد یا لخته‌سازی<sup>۶</sup> می‌باشند (Show et al., 2013). از بین روش‌های مختلف برداشت، روش لخته‌سازی یا انعقاد عملیاتی رایج و نسبتاً کارآمد برای بازیابی زی‌توده به حساب می‌آید که امکان جمع‌آوری و برداشت خمیر نسبتاً غلیظ را فراهم می‌کند (Goswami et al., 2019). روش لخته‌سازی با استفاده از لخته‌سازهای شیمیایی مختلف مانند نمک فلزهای معدنی مانند آهن، آلومینیوم و منیزیم معمولاً در مقیاس‌های بالا و برای طیف گسترده‌ای از گونه‌های ریزجلبک مورد استفاده قرار گرفته است (Grima et al., 2003; Mixson et al., 2014). اثربخشی این نمک‌های چند ظرفیتی به قدرت پیوند یونی<sup>۷</sup> و حلالیت آنها بستگی دارد و به طور کلی نمک‌های با قدرت پیوند یونی بیشتر و حلالیت کمتر انعقاد سریع‌تر ایجاد می‌کنند (Barros et al., 2015). کاتیون‌های سولفات آلومینیوم، کلرید آهن و سولفات آهن در pH مطلوب باعث کاهش بارهای منفی سطح سلول‌های ریزجلبک و تشکیل کمپلکس‌های پلی‌هیدروکسی شده که منجر به تجمع توده سلولی جامد و انعقاد سلول‌های ریزجلبک می‌شود (Chen et al., 2011; Vandamme et al., 2013). فرض بر این است که یک رابطه مستقیم خطی و استوکیومتری بین تعداد سلول‌های ریزجلبک و مقدار لخته‌ساز مورد نیاز بدون توجه به غلظت جلبک وجود دارد (گنجیان خناری و همکاران، ۱۳۹۱). بنابراین

<sup>2</sup> Centrifugation

<sup>3</sup> Filtration

<sup>4</sup> Settlement

<sup>5</sup> Flotation

<sup>6</sup> Coagulation or Flocculation

<sup>7</sup> Electronegativity

ZnCl<sub>2</sub> و میکروالمنتها نظیر FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O، MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O، CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O، CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O و NH<sub>4</sub>6Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O از شرکت (SIGMA Ltd) تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. pH محیط کشت در حدود ۷/۵ تنظیم شد (Ben-Amotz, 1982). محیط کشت ساخته شده در دستگاه اتوکلاو ضد عفونی و در یخچال (۴ درجه سانتی گراد) نگهداری شد. کشت ریز جلبک به روش دسته ای یا دوره ای (Batch culture) انجام شد. شرایط محیطی اتاق کشت در شدت نور ۳۳۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه و دمای ۲۹ ± ۲ درجه سانتی گراد و شوری ۹۰ گرم در لیتر تنظیم شد (اربابی و همکاران، ۱۳۹۹).

### آماده سازی غلظت های مختلف ماده لخته ساز کلرید آلومینیوم

نمونه های ریز جلبک در استوانه مدرج شیشه ای (یک لیتری) با غلظت کاملاً مشابه و همگن (۰/۹ گرم در لیتر، یا ۱۰<sup>۶</sup> × ۰/۸ سلول در میلی لیتر) توزیع شدند. به منظور اندازه گیری راندمان برداشت میزان غلظت اولیه ریز جلبک های معلق در استوانه مدرج شیشه ای با سنجش جذب نوری آنها در طول موج ۶۸۰ نانومتر خوانده شد. سپس غلظت های مختلف کلرید آلومینیوم (۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، و ۱ گرم در لیتر، A1, A2, A3, A4, A5) به محیط کشت ریز جلبک ها افزوده شد. سپس محیط کشت کاملاً مخلوط و اجازه داده شد در دمای اتاق به صورت ثابت باقی بمانند. برای تعیین راندمان برداشت، پس از گذشت هفت ساعت از زمان انعقاد و ته نشینی نمونه برداری از قسمت فوقانی مزورهای شیشه ای انجام شده و میزان جذب نوری آنها

هزینه به ازای هر تن جلبک تابعی از هزینه لخته ساز است. استفاده از این روش در عین حال چالش هایی نیز دارد که از جمله آن احتمال بر جای ماندن نمک های فلزی در زی توده تولید شده است (Henderson *et al.*, 2010).

با توجه به چالش جدی فرآیند برداشت ریز جلبک *D. salina* که مسئله مهمی در مسیر گسترش تولید انبوه این ریز جلبک است، لذا در این مطالعه روش استفاده از نمک کلرید آلومینیوم به عنوان لخته ساز بر راندمان برداشت و ترکیب رنگدانه های کلروفیل، کارتنوئید کل و بتاکاروتن ریز جلبک *D. salina* مورد بررسی قرار گرفت. همچنین امکان استفاده مجدد از محیط کشت لخته شده برای کشت های مجدد ریز جلبک نیز مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش ها

#### کشت سویه بومی ریز جلبک *D. salina*

در این تحقیق سویه بومی ریز جلبک *D. salina* که در مطالعات پیشین (امینی خوئی و همکاران، ۱۴۰۱) از کشتان پشت سدی لیپار (چابهار) جداسازی، خالص سازی و شناسایی مولکولی شده و با کد (Accession number: MZ831861.1) در سایت NCBI ثبت شده است مورد استفاده قرار گرفت. نگهداری و کشت و پرورش سویه مورد آزمایش در آزمایشگاه جلبک شناسی مرکز تحقیقات شیلاتی آب های دور چابهار صورت گرفت. محیط کشت جونسون<sup>۸</sup> اصلاح شده با کمی تغییرات برای کشت ریز جلبک *D. salina* استفاده شد. مواد شیمیایی محیط کشت شامل ماکروالمنتها مانند KNO<sub>3</sub>، KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>، NaHCO<sub>3</sub> و

<sup>9</sup> Optical Density

<sup>8</sup> Johnson

### سنجش محتوی رنگدانه‌های کلروفیل a و b، کارتوئید کل و بتاکاروتن

به منظور استخراج و سنجش محتوی رنگدانه‌های کلروفیل a و b، کارتوئید کل و بتاکاروتن ریزجلبک مورد آزمایش *Dunaliella salina*، در ابتدا ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون جلبک در بالاترین فاز نمایی رشد (روز هشتم تا چهاردهم در تیمارهای مختلف)، برداشت شده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع روی آن خارج و دور ریخته شد و به رسوب موجود در ته فالكون ۵ میلی لیتر استون ۸۰٪ اضافه و به خوبی مخلوط و همگن شد و به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه یخچال در تاریکی نگهداری شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید (Mota et al., 2015). محتویات کلروفیل a، کلروفیل b و کارتوئید کل در مایع رویی با اندازه گیری میزان جذب در طول موج ۴۴۰، ۶۴۶ و ۶۶۳ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Evolution™ 300 UV-Vis) تعیین گردید. غلظت‌ها با استفاده از معادلات زیر محاسبه شد (Lichtenthaler and Buschmann, 2001).

$$\text{Chlorophyll a } (\mu\text{g/ mL}) = (11.24 A_{660}) - (2.04 A_{645})$$

$$\text{Chlorophyll b } (\mu\text{g/ mL}) = (20.13 A_{645}) - (4.19 A_{660})$$

$$\text{Carotenoids } (\mu\text{g/ mL}) = 1000 \times (A_{470} - 1.90 \text{ Chl a} - 63.14 \text{ Chl b}) / 214$$

استخراج و سنجش بتا کاروتن به روش زیر اندازه گیری شد (Zhu et al., 2018). یک میلی لیتر از کشت سلولی در فاز نمایی برداشت شد به مدت ۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی آن دور ریخته شده و ۳ میلی لیتر دودکان و ۹ میلی لیتر متانول به آن افزوده شده و مجدداً به مدت ۵ دقیقه در دور

در طول موج ۶۸۰ نانومتر مجدداً قرائت شد (Teixeira et al., 2012).

به منظور تعیین ضریب تغلیظ نسبت جلبک ترسیب شده با غلظت اولیه در حالت شناور اندازه گیری شد (Wu et al., 2012). میزان راندمان برداشت و ضریب تغلیظ ریزجلبک مطابق رابطه‌های ۱ و ۲ در ذیل محاسبه شدند.

$$R = \frac{OD_i}{OD_i - R} \times 100 \quad (1)$$

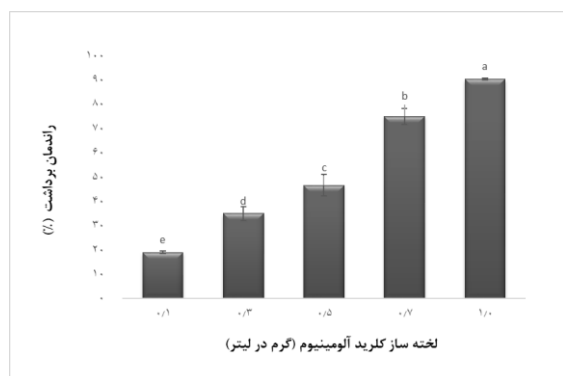
R: درصد راندمان برداشت ریز جلبک.  $OD_i$ : قبل از تغییر pH.  $OD_t$ : بعد از تغییر pH

$$CF = \frac{OD_i V_i - OD_t V_t}{OD_i V_f} \quad (2)$$

CF: ضریب تغلیظ.  $OD_i$ : جذب نوری ریزجلبک قبل از افزودن کلرید آلومینیوم.  $OD_t$ : جذب نوری ریزجلبک بعد از افزودن کلرید آلومینیوم که در آن  $OD_i$  و  $V_i$  (میلی لیتر) جذب نوری اولیه در ۶۸۰ نانومتر و حجم جلبک شناور (قبل از افزودن لخته ساز)،  $OD_t$ : جذب نوری نمونه بعد از افزودن لخته ساز است.  $V_f$  و  $V_t$  به ترتیب حجم فاز آبی و حجم فاز محیط کشت جلبک ته نشین شده هستند (Pérez et al., 2017).

### امکان سنجی استفاده مجدد از محیط کشت لخته شده

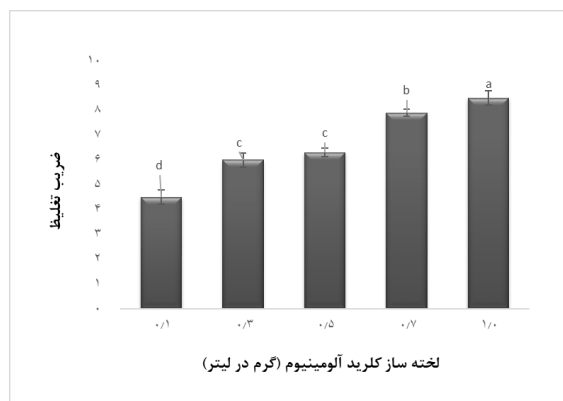
پس از برداشت سلول‌های ریزجلبک از محیط کشت مایع، امکان یازیبایی و استفاده مجدد از آب، محیط کشت و سلول‌های باقی مانده از آنها در کشت‌های تازه بررسی شد. بدین منظور فاز بالایی محیط کشت که و بی‌رنگ شفاف بود مجدداً برای کشت‌های تازه مورد استفاد. بنابراین محیط کشت برای استفاده مجدد در محیط رشد تازه مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۱: درصد راندمان برداشت در سطوح مختلف لخته کننده

### تاثیر سطوح مختلف لخته ساز کلرید آلومینیوم بر ضریب تغلیظ

یکی دیگر از شاخص‌های سنجش میزان اثر بخشی مواد لخته ساز برای برداشت، ضریب تغلیظ است که با تقسیم مقدار ریزجلبک تغلیظ شده پس از افزودن لخته ساز به غلظت اولیه آن در مرحله شناوری به دست آمد. در شکل ۲، ضریب تغلیظ ریزجلبک در تیمارهای مختلف کلرید آلومینیوم با یکدیگر مقایسه شده است. آنالیز داده ها نشان داد که ضریب تغلیظ در تیمارهای A1 تا A5 از ۴/۵ تا ۶، ۶/۳، ۷/۹ و ۸/۵ متغیر بوده و تفاوت معنی داری در تیمارهای مختلف مشاهده شد ( $p < 0.05$ ).



شکل ۲: ضریب تغلیظ در سطوح مختلف لخته کننده

۵۰۰۰ g سانتریفوژ شد. محلول بالای که حاوی بتاکاروتن است در دو طول موج ۴۵۳ و ۶۶۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت و با معادله ذیل محاسبه شد.  

$$\beta\text{-carotene } (\mu\text{g/ mL}) = (A453 - A665/3.91) \times 3.657 \times 3 \times X$$
 ۳ میلی لیتر دودکان اضافه شده برای استخراج، و X ضریب رقت برای اندازه گیری جذب در اسپکتروفتومتر است (Zhu et al., 2018).

### تحلیل آماری

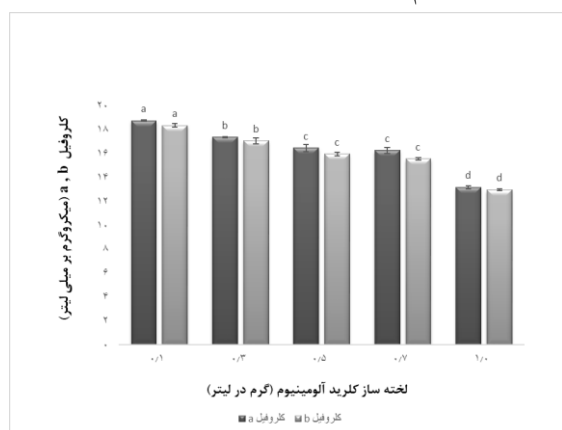
تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و ویرایش ۱۶ و ترسیم نمودارها در نرم افزار اکسل و ویرایش ۲۰۱۰ انجام شد. برای مقایسه بین تیمارها از آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) و جهت مقایسه میانگین ها از آزمون دانکن استفاده شد. تفاوت معنی دار داده های به دست آمده در سطح احتمال ۵ درصد بررسی گردید.

### نتایج

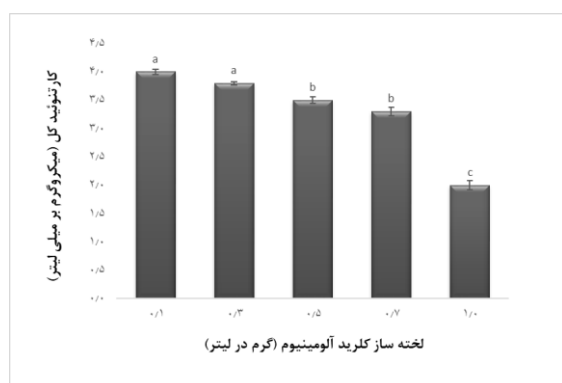
#### تاثیر سطوح مختلف لخته ساز کلرید آلومینیوم بر راندمان برداشت

راندمان برداشت زی توده یا همان لخته سازی ریزجلبک *D. salina* در تیمارهای مختلف کلرید آلومینیوم در شکل ۱ نشان داده شده است. آنالیز داده های این تحقیق نشان داد که ماده کلرید آلومینیوم تاثیر معنی داری بر فرآیند برداشت از طریق لخته شدن زی توده داشته است. با افزودن میزان کلرید آلومینیوم به سوسپانسیون ریزجلبک *D. salina* از ۰/۱ تا ۱ گرم بر لیتر میزان انعقاد و لخته سازی افزایش معنی داری داشته است ( $p < 0.05$ ). راندمان برداشت به صورت صعودی از ۱۹٪ در تیمار A1 تا ۳۵، ۴۶، ۷۵ و ۹۰٪ به ترتیب در تیمار A2, A3, A4 و A5 افزایش یافت.

به طوری که میزان آن در تیمار A1 تا A5 به ترتیب از ۴، ۳/۸، ۳/۵، ۳ تا ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر کاهش یافت. نتایج آنالیز و اندازه‌گیری بتاکاروتن زی‌توده لخته شده نیز نشان داد که کلرید آلومینیوم تأثیر معنی‌داری بر میزان و کیفیت رنگدانه بتاکاروتن داشته است ( $p < 0/05$ ). بالاترین میزان رنگدانه بتاکاروتن در تیمار A1 به میزان ۰/۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمترین آن در غلظت بالای کلرید آلومینیوم در تیمار A5 به میزان ۰/۰۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد ( $p < 0/05$ ).



شکل ۳: محتوی کلروفیل a, b در سطوح مختلف لخته کننده



شکل ۴: محتوی کارتنوئید کل در سطوح مختلف لخته کننده

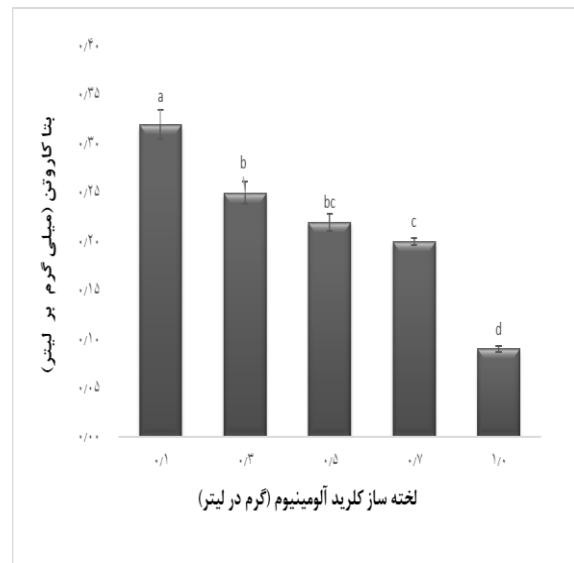
## استفاده مجدد از محیط کشت و سلول‌های لخته شده برای تلقیح جدید

امکان استفاده مجدد از محیط کشت و سلول‌های لخته شده برای تلقیح جدید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پس از تنظیم pH به حالت اولیه، استفاده مجدد از محیط کشت در تمام تیمارهای مورد آزمایش A1 تا A5 برای کشت جدید امکان‌پذیر است و میزان رشد ریزجلبک *D. salina* در محیط بازیافت شده تفاوت معنی‌داری با محیط کشت تازه نشان نداد ( $p > 0/05$ ). همچنین از سلول‌های ریزجلبک که ترسیب شده و در فاز پایینی وارد شدند برای استفاده مجدد و تلقیح به محیط کشت تازه استفاده شد که مشاهدات میکروسکوپی نشان داد این سلول‌ها تا حدود زیادی فعالیت زیستی خود را از دست داده و قابلیت استفاده مجدد برای تلقیح به محیط کشت جدید را از دست دادند.

## محتوی کلروفیل، کاروتنوئید کل و بتاکاروتن زی‌توده لخته شده ریزجلبک *D. salina*

در مرحله نهایی آزمایشات، تأثیر استفاده از لخته ساز شیمیایی کلرید آلومینیوم بر محتوی کلروفیل، کاروتنوئید و بتاکاروتن ریزجلبک برداشت شده *D. salina* مورد سنجش قرار گرفت (شکل‌های ۳ تا ۵). آنالیز داده‌ها نشان داد که با افزایش مقدار کلرید آلومینیوم از ۰/۱ گرم در لیتر در تیمار A1 تا ۱ گرم در لیتر در تیمار A5 محتوی کلروفیل a از ۱۸/۸ تا ۱۳/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش یافت. کلروفیل b نیز روند مشابه داشته و افزایش کلرید آلومینیوم در مقادیر بالای ۰/۷ گرم در لیتر باعث کاهش معنی‌دار تا ۱۳ میکروگرم در میلی‌لیتر شد. میزان کارتنوئید کل زی‌توده لخته شده نیز تحت تأثیر ماده لخته کننده تغییر کرد

*salina* شروع به انعقاد کرده و لخته های جلبک شکل گرفتند. با افزودن غلظت نمک آلومینیوم این روند نیز سرعت بیشتری گرفت به طوری که راندمان برداشت از ۱۹٪ در تیمار ۰/۱ گرم در لیتر تا ۷۵٪ و در نهایت ۹۰٪ در تیمار ۰/۷ و ۱ گرم در لیتر افزایش یافت. ضریب تغلیظ نیز در تیمار A1 ۴/۵، در A4، با مصرف ۰/۷ گرم در لیتر نمک آلومینیوم ۷/۹ و در تیمار A5 به میزان ۸/۵ به دست آمد. لخته سازی خود به خودی و ترسیب در شرایط معمولی و تا قبل از اضافه کردن لخته ساز در ریزجلبک *D. salina* مورد آزمایش مشاهده نشد. این نتایج نشان می دهد که لخته ساز کلرید آلومینیوم با غلظت بالاتر از ۰/۷ گرم در لیتر کارایی نسبتاً مناسبی برای آب زدایی و تغلیظ زی توده ریزجلبک *D. salina* داشته است. مزیت اصلی فرآیند جداسازی با استفاده از کاتیون های فلزی، راندمان بالا و هزینه ها عملیاتی کم، همراه با پردازش ساده و سریع است. ایده استفاده از کاتیون های فلزی برای جداسازی جلبک ها به تجربه استفاده از آنها برای جداسازی و ترسیب در تصفیه فاضلاب ها باز می گردد. لخته سازی شیمیایی جلبک ها به دلیل خنثی سازی بار و ایجاد پل الکترواستاتیکی بین سلول های معلق و عامل لخته ساز اتفاق می افتد، که منجر به تشکیل لخته و رسوب گذاری می شود (Gerde et al., 2014). استفاده از نمک های کاتیونی به عنوان لخته سازهای شیمیایی برای برداشت ریزجلبک های مختلف توسط سایر محققین نیز تأیید شده است (Sanyano et al., 2013). برای مثال نتایج مطالعه Known و همکاران، ۲۰۱۴ نشان داد که استفاده از ۱/۲ گرم در لیتر نمک سولفات آلومینیوم و ۰/۷ گرم در لیتر نمک سولفات آهن راندمان برداشت را در ریزجلبک *Tetraselmis sp* به ترتیب تا ۸۵ و ۹۶ درصد افزایش



شکل ۵: محتوی بتاکاروتن در سطوح مختلف لخته کننده

## بحث

پس از طی دوره رشد ریزجلبک ها و رسیدن به حداکثر زی توده نوبت به مرحله برداشت و تغلیظ زی توده آن برای خمیر غلیظ آغاز می گردد. این مرحله با چالش جدی در مصرف انرژی زیاد و هزینه های بالا همراه است و یکی از دلایل عدم توسعه سایت های تولید تجاری ریزجلبک ها هزینه بر بودن فرآیند برداشت آنها می باشد. بنابراین یافتن دانش و روشی که حداکثر بهره وری را در این فرآیند ایجاد کند؛ بسیار ضروری است. بنابراین تحقیق حاضر به بررسی میزان کارایی و راندمان روش لخته سازی شیمیایی برای جمع آوری و برداشت زی توده ریزجلبک *D. Salina* از سوسپانسیون محیط رشد رقیق آن پرداخت. در گام اول تأثیر غلظت های مختلف از ۰/۱ تا ۱ گرم بر لیتر از نمک فلزی کلرید آلومینیوم برای آب زدایی و برداشت زی توده این ریزجلبک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش نشان داد که با افزودن نمک فلزی کلرید آلومینیوم به محیط کشت، زی توده ریزجلبک *D.*

داده است. Sanyano و همکاران، ۲۰۱۳ نیز دریافتند که لخته سازی بهینه در زی توده ریز جلبک *Chlorella sp.* با استفاده از ۱۴۳ میلی گرم در لیتر کلرید آهن در pH برابر ۸/۱ قابل دستیابی است. Gerde و همکاران، ۲۰۱۴ استفاده از ۱۸۰ میلی گرم در لیتر از نمک  $Al_2(SO_4)_3$  برای ریز جلبک *Scenedesmus sp.* را مناسب تشخیص دادند. Papazi و همکاران در سال ۲۰۱۰، از نمک‌های آلومینیوم و آهن برای لخته کردن زی توده ریز جلبک *Chlorella sp.* استفاده کردند و نتایج آنها نشان داد که نمک آلومینیوم نسبت به آهن عملکرد بهتری داشته است. به طور کلی مقایسه تأثیر آلوم با نمک‌های آهن نشان داده است که از نظر مقدار بهینه مصرف، کیفیت خمیر تغلیظ شده و همچنین کیفیت آب بازیافت شده تیمارهای آلوم وضعیت مناسب تری نسبت به نمک‌های آهن داشته است. Vandamme و همکاران، ۲۰۱۵ نشان دادند که نمک منیزیم می‌تواند به طور مؤثر به عنوان یک لخته کننده برای برداشت ریز جلبک *Chlorella sp.* استفاده گردد. این محققین دریافتند که لخته سازی ریز جلبک‌ها به خصوص به pH کشت حساس است. افزایش pH ممکن است بر بار سلول‌های ریز جلبک تأثیرگذار بوده و منجر به افزایش روند هیدرولیز کاتیون‌های فلزی در سوسپانسیون ریز جلبک گردد.

در بخش دوم این تحقیق پس از برداشت زی توده ترکیبات رنگدانه‌های زی توده برداشت شده شامل کلروفیل a, b، کارتنوئید کل و بتاکاروتن در غلظت های ۰/۱ تا ۱ گرم در لیتر کلرید آلومینیوم مقایسه شد. نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد که مصرف لخته ساز رنگدانه‌های زی توده را تحت تأثیر قرار داده است، به طوری که با افزایش مصرف غلظت کلرید آلومینیوم میزان کلروفیل، کارتنوئید کل و بتاکاروتن زی توده

کاهش یافته است. بر اساس اطلاعات و مرور منابع پیشین تاکنون مطالعه اختصاصی در مورد تأثیر لخته ساز بر رنگدانه های زی توده ریز جلبک‌های مورد آزمایش گزارش نشده است. به نظر می‌رسد با توجه به حساسیت بسیار زیاد رنگدانه های ریز جلبک‌ها و ساختار شیمیایی آنها که معمولاً به صورت ایزومرهای ناپایدار سیس در کارتنوئیدها علت احتمالی می‌تواند مربوط به واکنش شیمیایی اکسایشی فلز آلومینیوم با ایزومرهای حساس و ناپایدار در زی توده تولید شده باشد. اما نکته قابل توجه آن است که هر روش برداشت اختصاصات فنی و اقتصادی ویژه خود را دارد و معمولاً بر اساس محصول هدف روش برداشت انتخاب می‌گردد. بر اساس نتایج این تحقیق در مواردی که تولید رنگدانه‌های ریز جلبک‌ها مورد نظر است بایستی در مصرف لخته سازها دقت بیشتری صورت گیرد. البته ملاحظات اقتصادی تولید نیز بایستی به صورت هم‌زمان مورد توجه قرار گیرد. در مجموع به طور هم‌زمان بایستی هم راندمان برداشت و ضریب تغلیظ نسبتاً مناسب را در نظر گرفت و از طرفی کیفیت رنگدانه‌ها با توجه به هدف تولید نیز بایستی در حد قابل قبول حفظ گردد.

بنابراین، براساس داده‌های راندمان برداشت و محتوی رنگدانه های تولید شده این تحقیق به نظر می‌رسد مصرف ۰/۷ گرم در لیتر لخته کننده، حداکثر مجاز میزان مصرف کلرید آلومینیوم می‌باشد زیرا هم راندمان برداشت نسبتاً بالایی داشته و در عین حال محتوی رنگدانه های ارزشمند زی توده ریز جلبک *D. salina* تا حدودی قابل قبولی حفظ شده است.

## سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نمایم.

## منابع

1. امینی خوئی، ز.، نادری سامانی، م.، طاهرپناه، س.، رحیمی قره میرشاملو، ق.، ۱۴۰۱. جداسازی، خالص سازی و شناسایی ریختی و مولکولی دو گونه ریزجلبک نمکدوست از کشتان پشت سدی لیپار (سواحل دریای عمان، چابهار). دو فصلنامه علوم آبی پروری، (۱۰)، ۴۵-۵۵.
  2. اربابی، س.، اکبری، پ. و امینی خوئی، ز.، ۱۳۹۹. بررسی تأثیر روش لخته سازی بر راندمان برداشت زی توده و محتوی اسیدهای چرب ریزجلبک *Dunaliella salina* جداسازی شده از تالاب لیپار، چابهار. مجله علمی شیلات ایران، (۶)، ۱۲۰-۱۰۹.
  3. شعبانزاد، ز.، ایمانپور نمین، ج.، رمضانپور، ز.، ۱۳۹۸. استخراج و بررسی فعالیت ضدباکتری عصاره های اتری و هگزانی ریزجلبک *Chlorella vulgaris* در شرایط آزمایشگاهی بر باکتریهای *Micrococcus* و *Aeromonas hydrophila luteus*. نشریه توسعه آبی پروری، ۱۳ (۳) ۶۵-۵۵.
  4. گنجیان خناری، ع.، شکوری، م.، قاسم نژاد، م.، گنجیان خناری، ف.، فارابی، و.، ۱۳۹۱. بررسی تاثیر بی کربنات سدیم بر رشد میکروجلبک کلرلا (*Chlorella sp.*) در محیط کشت TMRL. نشریه توسعه آبی پروری، ۶ (۲)، ۶۵-۵۷.
5. Barros, A.I.; Gonçalves, A.L.; Simões, M.; Pires, J. C. M., 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. Renewable and sustainable energy reviews, 41, 1489-1500.
  6. Ben Amotz, A., Katz, A., and Avron, M., 1982. Accumulation of beta -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of beta -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (chlorophyceae). Journal of applied phycology, 18 (4): 529-537.
  7. Buelna, G., Bhattarai, K. K., De La Noue, J & Taiganides, E.P., 1990. Evaluation of various flocculants for the recovery of algal biomass growth on pig-waste. Biological wastes, 31, 211-222.
  8. Chen, C. Y., Yeh, K.L., Aisyah, R., Lee, D.J. and Chang, J.S., 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. Bioresource technology, 102(1), 71-81.
  9. Gerde, J. A., Yao, L., Lio, J., Wen, Z. and Wang, T., 2014. Microalgae flocculation: impact of flocculant type, algae species and cell concentration. Algal research, 3: 30-35.
  10. Goswami, G., Kumar, R., Sinha, A., Maiti, S.K., Dutta, B.C., Singh, H. & Das, D., 2019. A low-cost and scalable process for harvesting microalgae using commercial-grade flocculant. RSC Advances, 9(67), 39011-39024.
  11. Grima, E.M., Belarbi, E.H., Fernández, F.A., Medina, A.R. & Chisti, Y., 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnology advances, 20(7-8), 491-515.
  12. Hejazi, M., Kleingris, D. & Wijffels, R. 2004. Mechanism of extraction of  $\beta$ -carotene from microalga *Dunaliella salina* in two-phase bioreactors. Biotechnology and bioengineering, 88, 593-600.
  13. Henderson, R.K., Parsons, S.A. and Jefferson, B., 2010. The impact of differing cell and algogenic organic matter (AOM) characteristics on the coagulation and flotation of algae. Water research, 44(12), 3617-3624.

23. Vandamme, D., Beuckels, A., Markou, G., Foubert, I. and Muylaert, K., 2015. Reversible flocculation of microalgae using magnesium hydroxide. *BioEnergy Research*, 8(2), 716-725.
24. Vandamme, D., Foubert, I., Muylaert, K., 2013. Flocculation as a lowcost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends Biotechnol*, 31, 233–239.
25. Widowati, I., Zainuri, M., Kusumaningrum, H. P., Susilowati, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., Bourgougnon, N. and Mouget, J.-L., 2017. Antioxidant activity of three microalgae *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* and *Isochrysis galbana* clone Tahiti. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, IOP Publishing, 012067.
26. Wu, Z., Zhu, Y., Huang, W., Zhang, C., LI, T., Zhang, Y. & Li, A., 2012. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. *Bioresource technology*, 110, 496-502.
14. Kwon, H., Lu, M., Lee, E.Y. and Lee, J., 2014. Harvesting of microalgae using flocculation combined with dissolved air flotation. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 19(1), 143-149.
15. Lichtenthaler, H.K. and Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, 1(1), F4-3.
16. Mixson, S. M., Stikeleather, L. F., Simmons, O. D., Wilson, C. W. & Burkholder, J. M., 2014. pH-induced flocculation, indirect electrocoagulation, and hollow fiber filtration techniques for harvesting the saltwater microalga *Dunaliella*. *Journal of applied phycology*, 26, 1701-1709.
17. Morowvat, M. H. and Ghasemi, Y., 2016. Culture medium optimization for enhanced  $\beta$ -carotene and biomass production by *Dunaliella salina* in mixotrophic culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 217-223.
18. Mota, R., Pereira, S. B., Meazzini, M., Fernandes, R., Santos, A., Evans, C. A., De Philippis, R., Wright, P.C., Tamagnini, P., 2015. Effects of heavy metals on *Cyanothece* sp. CCY 0110 growth, extracellular polymeric substances (EPS) production, ultrastructure and protein profiles. *Journal of proteomics*, 120, 75–94.
19. Pérez, L., Salgueiro, J. L., Maceiras, R., Cancela, Á. & Sánchez, Á., 2017. An effective method for harvesting of marine microalgae: pH induced flocculation. *Biomass and Bioenergy*, 97, 2-26.
20. Sanyano, N., Chetpattananondh, P. and Chongkhong, S., 2013. Coagulation–flocculation of marine *Chlorella* sp. for biodiesel production. *Bioresource technology*, 147, 471-476.
21. Show, K.-Y., Lee, D.-J. & Chang, J.-S., 2013. Algal biomass dehydration. *Bioresource technology*, 14 (2): 557-577.
22. Teixeira, C. M. L. L., Kirsten, F. V. & Teixeira, P. C. N., 2012. Evaluation of *Moringa oleifera* seed flour as a flocculating agent for potential biodiesel producer microalgae. *Journal of applied Phycology*, 24, 557-563.